

## 쥐에서 Conjugated Linoleic Acid가 대장의 종양발생률과 항산화효소와 Eicosanoid 및 2차 담즙산 배설에 미치는 영향\*

김경희 · 강금지\*\* · 박현서\*\*\*§

전남대학교 의과대학연구소, 덕성여자대학교 식품영양학과, \*\* 경희대학교 식품영양학과\*\*\*

### Effect of Conjugated Linoleic Acid on Colon Tumor Incidence and Antioxidant Enzymes and Fecal Excretion of Secondary Bile Acids in DMH-treated Rats\*

Kim, Kyung-Hee · Kang, Keum-Jee\*\* · Park, Hyun-Suh\*\*\*§

Chonnam University Research Institute of Medical Sciences, Gwangju 501-746, Korea  
Department of Food & Nutrition, \*\* Duksung Women's University, Seoul 132-713, Korea  
Department of Food & Nutrition, \*\*\* Kyung Hee University, Seoul 132-714, Korea

#### ABSTRACT

The study was designed to observe the effect of conjugated linoleic acid (CLA) on tumor incidence, eicosanoid formation and antioxidant enzyme activities in colonic mucosa and the fecal excretion of deoxycholic acid and lithocholic acid in 1,2-dimethylhydrazine (DMH)-treated rats. One hundred twenty male Sprague Dawley rats were divided into 2 groups, BT (beef tallow diet) group and FO (fish oil diet) group, and each group was again subdivided into 2 groups depending on CLA supplementation, i. e. 4 groups of BT, BTC, FO, FOC. All rats were fed experimental diet for 30 weeks, which contained 12% (wt/wt) total dietary fat including 1% (wt/wt) CLA, and were intramuscularly injected with DMH for 6 weeks to give total dose of 180 mg/kg body. CLA-supplemented to BT and FO diet reduced tumor incidence, eicosanoid (PGE<sub>2</sub> and TXA<sub>2</sub>) level in colonic mucosa. N-3 fatty acids (mainly DHA) of fish oil diet (FO, FOC group) also reduced tumor incidence and significantly reduced eicosanoid (PGE<sub>2</sub> and TXA<sub>2</sub>) level in colonic mucosa. CLA supplementation and n-3 fatty acid significantly increased colonic mucosal level of superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities but reduced secondary bile acids (deoxycholic acid and lithocholic acid) excretion in the feces. In conclusion, CLA supplementation and n-3 fatty acid could reduce tumor incidence by reducing eicosanoids and increasing antioxidant enzyme activities in colon and decreasing the excretion of deoxycholic acid and lithocholic acid in the feces. The data might suggest that CLA supplementation and n-3 DHA rich fish oil may modulate colon carcinogenesis. (*Korean J Nutrition* 35(10) : 1038~1044, 2002)

**KEY WORDS:** conjugated linoleic acid, eicosanoids, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, secondary bile acid.

#### 서론

미국 Wisconsin대학 독성학 연구실에서는 쇠고기로부터 전혀 예기치 못한 항암물질을 분리하였는데<sup>1)</sup> 이 항암물질을 필수지방산인 linoleic acid (LA)의 이성체인 conjugated linoleic acid (CLA)로 명명하였다. CLA는 반추동물의 육고기와 다양한 낙농제품 (우유와 치즈)에 많이 함유되어 있다.<sup>2)</sup>

접수일: 2002년 8월 27일

채택일: 2002년 11월 18일

\*This work was supported by a grant from KOSEF 981-0610-048-2.

§To whom correspondence should be addressed.

7,12-dimethylbenzanthracene (DMBA)로 대장암을 유발시킨 쥐에서 필수지방산인 linoleic acid (LA)를 식이 무게의 4% 함유한 실험식을 공급하였을 때 대장의 종양 발생률이 증가하였다는 보고<sup>3,4)</sup>와는 다르게 LA의 이성체인 conjugated linoleic acid (CLA)는 막의 지방산 조성을 변화시켜 eicosanoids 합성을 변화시킴으로 인해 암발생을 억제시키는 효과가 있었다고 보고되었다.<sup>1,5)</sup> 지금까지 연구된 CLA는 면역기능을 높여주고, 체지방을 감소시키고, 식이효율과 체중을 감소시키고, LDL-cholesterol을 낮추어 주어 항동맥경화인자로 작용한다고 밝혀졌으며 특히 강한 항암작용이 있는 것으로 보고되었다.<sup>6,9)</sup> 동물실험에 의하면 CLA는 유방암,<sup>10)</sup> 피부암,<sup>11)</sup> 전립선암,<sup>12)</sup> 대장암<sup>13)</sup>의 유발 및 발생을 저해한다고 보고되었으나, 현재 CLA가 암화과정에

미치는 영향에 관해서는 명확하게 밝혀지지 않았으므로 본 연구에서는 CLA가 대장암 암화과정에 미치는 영향을 살펴 보고자 한다.

보고된 바<sup>14)</sup>에 의하면 CLA는 강력한 항산화작용을 통해 암화과정을 억제시켜 줄 수 있는 가능성이 있다는 것이다. 세포내에서 CLA의 생화학적 작용과 항암기전은 아직 밝혀지지 않았으나 조직에서 강력한 항산화제로서 작용하여 *in vitro*와 생체내에서 산화적 stress를 억제시킨다고 보고되었다.<sup>2,15)</sup> 또한 소장에서 흡수되지 않은 CLA는 대장에서 항균작용을 하여 미생물 군총에 영향을 미쳐서 대장에서 종양발생을 촉진하는 인자인 2차 bile acid 생성을 감소시킬 지도 모른다. 또한 Park<sup>16)</sup>의 연구에서는 DMH로 대장암을 유발시킨 쥐에게 섭취시킨 CLA가 대장점막조직의 PGE<sub>2</sub>와 TXB<sub>2</sub>의 함량을 낮추고, 인지질내의 arachidonic acid의 함량을 낮춤으로써 대장의 암화과정을 억제하였다고 보고하였다.

따라서 본 연구에서는 화학적 발암원으로 대장암을 유발한 후, CLA를 지방원을 달리한 식이에 첨가하여 CLA가 암화과정에 미치는 영향을 살펴보고자 대장점막의 항산화효소인 superoxide dismutase (SOD)와 glutathione peroxidase (GSH-Px)의 활성도, eicosanoids의 함량과 변으로 배설되는 2차 담즙산을 측정하여 CLA의 항암작용에 관하여 연구하였다.

## 실험재료 및 방법

### 1. 실험계획

생후 7주된 Sprague Dawley종 수컷쥐를 체중에 따라 난괴법에 의하여 30마리씩 4군으로 나누었다. 즉 실험군은 식이지방의 급원에 따라서 쇠기름 (beef tallow: BT)과 어유 (fish oil: FO) 2군으로 나누고, 각 군을 다시 CLA의 첨가 유무에 따라서 2군으로 나누어 각각의 실험식으로 30주간 사육하였다. 화학적 발암원으로는 1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride (DMH, 99%, Aldrich Chemical Co, Wis)를 주 2회씩 체중 kg당 15 mg을 6주간 근육주사하여 총투여량이 180 mg/kg이 되도록 하였다.

실험식은 Table 1에서와 같이 총열량 중 단백질이 약 20.9%, 당질이 약 53.5%, 지방이 25.6% (12%, w/w)가 되도록 구성하였으며, 지방의 종류와 CLA 첨가 유무만 다르게 하고 다른 성분의 양은 동일하게 하였다. 어유는 docosahexaenoic acid (DHA)가 주로 함유된 것을 사용하였으며, CLA첨가군에는 CLA 혼합물이 총 식이무게의 1%

Table 1. Diet composition of experimental groups

| Ingredients               | Dietary groups |        |        |        |
|---------------------------|----------------|--------|--------|--------|
|                           | BT             | BTC    | FO     | FOC    |
| Corn starch               | 56.50          | 56.50  | 56.50  | 56.50  |
| Casein                    | 22.00          | 22.00  | 22.00  | 22.00  |
| L-methionine              | 0.30           | 0.30   | 0.30   | 0.30   |
| Cellulose                 | 4.00           | 4.00   | 4.00   | 4.00   |
| Fat or oil                |                |        |        |        |
| Beef tallow               | 9.64           | 8.39   | 0.00   | 0.00   |
| Corn oil                  | 2.36           | 2.36   | 2.61   | 2.61   |
| Fish oil                  | 0.00           | 0.00   | 9.39   | 8.14   |
| CLA                       | 0.00           | 1.25   | 0.00   | 1.25   |
| Mineral mix <sup>1)</sup> | 4.00           | 4.00   | 4.00   | 4.00   |
| Vitamin mix <sup>2)</sup> | 1.00           | 1.00   | 1.00   | 1.00   |
| Choline bitartrate        | 0.20           | 0.20   | 0.20   | 0.20   |
| Total                     | 100.00         | 100.00 | 100.00 | 100.00 |

<sup>1)</sup>AIN 76 Mineral mixture; g/kg of mix : Calcium phosphate, di-basic 500 ; Sodium chloride 74 ; Potassium citrate, monohydrate 220 ; Potassium sulfate : 52 ; Magnesium oxide 24 ; Manganous carbonate (43-48% Mn) 3.5 ; Ferric citrate (16-17% Fe) 6 ; Zinc carbonate (70% ZnO) 1.6 ; Cupric carbonate (53-55% Cu) 0.3 ; Potassium iodate 0.01 ; Sodium selenite 0.01 ; Chromium potassium sulfate 0.55 ; Sucrose, finely powdered 118.03

<sup>2)</sup> AIN 76 Vitamin mixture (Modified without vitamin E and vitamin A) ; g/kg of mix : Thiamine hydrochloride 0.6 ; Riboflavin 0.6 ; Pyridoxine hydrochloride 0.7 ; Nicotinic acid 3.0 ; D-calcium pantothenate 1.6 ; Folic acid 0.2 ; D-biotin 0.02 ; Cyanocobalamin 0.001 ; Cholecalciferol (400,000 IU/g) 0.25 ; Manaquinone 0.005 ; Ascorbic acid 0.2 ; Sucrose, finely powdered 992.824

(w/w)수준으로 safflower oil로 합성한 CLA를 첨가하였다 (경상대학교 농화학과 연구실에서 제조). CLA의 순도는 80%였고 cis-9, trans-11 CLA와 trans-10, cis-12 CLA의 조성은 총 CLA의 각각 50%였다. 쇠기름과 어유에는 필수지방산이 부족하므로 n-6 linoleic acid의 급원으로 옥수수 기름을 첨가하였으며 어유 섭취군에는 산패를 예방하기 위하여 불포화정도를 고려하여 dl- $\alpha$ -tocopherol (145.6 mg/100 g oil)을 첨가하였다.

### 2. 시료준비

실험기간이 끝나는 날 공복상태에서 diethylether로 마취시켜 대장을 절개한 후 장내용물을 제거하고 PBS buffer로 닦아낸다. 대장의 길이를 잴 후 proximal 부분과 distal 부분으로 나누어서 각 부위의 중양수를 세었으며 종양의 크기도 측정하였다. 스펙츨라를 이용해 대장의 점막을 조심스레 긁어서 SOD와 GSH-Px 분석을 위해 -70℃에 저장하였고, 대변은 실험이 끝나기 3일전부터 수거하여 건조시킨 후, 분쇄하여 담즙산을 측정하기 위해 -70℃에 저장하였다.

3. 생화학적 분석

1) 대장점막의 Superoxide dismutase와 glutathione peroxidase 활성도 측정

Superoxide dismutase (SOD) 활성도는 cytosol에서 Winterbourn의 방법<sup>17)</sup>으로 측정하였고, glutathione peroxidase (GSH-Px) 활성도는 같은 cytosol에서 Paglia와 Valentine의 방법<sup>18)</sup>으로 측정하였다.

2) 대장점막의 Prostaglandin E<sub>2</sub> 및 thromboxane A<sub>2</sub> 함량 측정

TXA<sub>2</sub><sup>19)</sup>와 PGE<sub>2</sub><sup>19,20)</sup> 분석을 위해 대장점막의 일정량을 취해서 indomethacin이 함유된 0.05M Tris buffer (pH 8.0, 0.25M sucrose, 1 mM EDTA) 2 ml를 첨가한 후 균질화한다. 균질액을 37°C shaking water bath에 30분간 방치하였다가 0.35 ml ice cold ethanol을 첨가하고 여기에 1M citric acid를 첨가하여 pH 3~3.5의 산성상태로 만든 후 원심분리하였다 (4000 × g, 15 min). 상층액을 취하여 C-18 solid phase extraction column에 loading하여 처리한 후 methylformate를 통과시켜 얻은 용출액을 질소 가스로 건조시킨 뒤 assay buffer에 용해시켜 TXA<sub>2</sub>와 PGE<sub>2</sub>를 각각 TXA<sub>2</sub> enzyme immunoassay (EIA) system과 PGE<sub>2</sub> EIA system을 사용하여 측정하였다.

3) 변종의 담즙산 함량 측정

냉동 건조된 변을 분쇄하여 그 중 약 1 g을 취하여 Uchida et al.<sup>21)</sup>의 방법으로 담즙산층을 분리하고 internal standard로 일정량의 5 $\alpha$ -cholestane를 넣고 ether-alcoholic diazomethane으로 메틸화시킨 다음 trifluoroacetic acid를 첨가하여 다시 37°C heating block에서 30분간 방치하여 건조시킨 다음 acetone에 녹여 gas chromatograph

(Hewlett Packard 5890 II)로 분석하였다. 이때 사용된 column은 HP-1 0.25 mm ID × 25 m를 사용하였으며 injection temp.는 265°C이고, detector temp.는 265°C이며, nitrogen, hydrogen, air gas의 flow rate는 각각 28 ml/min, 30 ml/min, 200 ml/min으로 하였다. Oven temp.는 200°C에서 250°C까지 2°C/min씩 상승하도록 하였고, 2차 담즙산의 retention time은 standard와 비교하여 확인한 다음 첨가한 5 $\alpha$ -cholestane의 양으로부터 산출하였고, 각 담즙산의 함량을 구한 다음 합산하여 total bile acid의 함량으로 사용하였다.

4. 통계처리

모든 실험결과는 SAS program의 general linear model (GLM)을 이용하여 p < 0.05 유의수준에서 Duncan's multiple range test로 검증하였으며, CLA와 식이지방 종류의 효과를 보기 위해 two-way ANOVA-unbalanced design을 사용하였고 모든 실험결과는 평균 (mean) ± 표준편차 (standard deviation, SD)로 표시하였다.

결 과

1. 대장의 종양발생률

식이지방에 첨가한 CLA가 대장의 종양발생률에 미친 영향을 Table 2에서 보면 CLA무첨가군 (BT, FO)에 비해 CLA첨가군 (BTC, FOC)은 종양을 가진 동물수와 종양발생률, 총 종양수 및 마리당 평균종양수가 적었다. 또한 전체적으로 BT를 먹인 군 (BT, BTC)에 비해 FO를 먹인 군 (FO, FOC)에서 낮았다. Table 3에서 종양의 크기와 분포를 살펴보면 종양의 크기가 직경이 1 mm 미만인 것이 가장 많았으며, 어유를 먹인 군 (FO, FOC)에 비해 BT를 먹

Table 2. Effect of CLA supplementation on tumor incidence in colon of 1,2-dimethylhydrazine-treated rats

| Dietary groups | No. of rats | No. of tumor-bearing rats | Incidence (%) | No. of total tumors | Avg No. of tumors per rat |
|----------------|-------------|---------------------------|---------------|---------------------|---------------------------|
| BT             | 30          | 12                        | 40            | 18                  | 0.60                      |
| BTC            | 30          | 7                         | 23            | 10                  | 0.33                      |
| FO             | 30          | 6                         | 20            | 7                   | 0.23                      |
| FOC            | 30          | 4                         | 13            | 4                   | 0.13                      |

Table 3. Effect of CLA supplementation on tumor size and tumor distribution in colon of 1,2-dimethylhydrazine-treated rats

| Groups      | Tumor size (mm) |     |     | Number of tumors in tumor-bearing rats |   |   | Size of tumors in large intestine |        |
|-------------|-----------------|-----|-----|--|---|---|-----------------------------------|--------|
|             | < 1             | 1~3 | 4~6 | 1                                      | 2 | 3 | Proximal                          | Distal |
| No. of rats |                 |     |     |  |   |   |                                   |        |
| BT          | 16              | 2   | -   | 8                                      | 2 | 2 | 6                                 | 12     |
| BTC         | 8               | 2   | -   | 4                                      | 3 | - | 4                                 | 6      |
| FO          | 4               | 2   | 1   | 5                                      | 1 | - | 1                                 | 6      |
| FOC         | 4               | -   | -   | 4                                      | - | - | 3                                 | 1      |

**Table 4.** Effect of CLA and n-3 fatty acid supplementation on superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities of colonic mucosa in 1,2-dimethylhydrazine-treated rats

| Dietary groups | SOD                       | GSH-Px                      |
|----------------|---------------------------|-----------------------------|
|                | Units/mg protein          |                             |
| BT             | 16.15 ± 3.19 <sup>c</sup> | 298.87 ± 10.98 <sup>c</sup> |
| BTC            | 30.30 ± 2.60 <sup>b</sup> | 334.62 ± 9.90 <sup>b</sup>  |
| FO             | 31.54 ± 2.17 <sup>b</sup> | 328.40 ± 7.92 <sup>b</sup>  |
| FOC            | 36.86 ± 1.65 <sup>a</sup> | 347.96 ± 6.89 <sup>a</sup>  |
| P-value        |                           |                             |
| CLA            | 0.0001                    | 0.0001                      |
| Oil            | 0.0001                    | 0.0001                      |
| CLA × oil      | 0.0010                    | NS                          |

Values with different letters are significant at  $p < 0.05$ .  
Values are means × SD. Number of rats : 10

**Table 5.** Effect of CLA and n-3 fatty acid supplementation on levels of colonic mucosal PGE<sub>2</sub> and TXA<sub>2</sub> in 1,2-dimethylhydrazine-treated rats

| Dietary group | (n) | PGE <sub>2</sub> (ng/mg tissue) | TXA <sub>2</sub> (ng/mg tissue) |
|---------------|-----|---------------------------------|---------------------------------|
| BT            | 6   | 5.88 ± 0.61 <sup>a</sup>        | 8.52 ± 2.56 <sup>a</sup>        |
| BTC           | 6   | 4.83 ± 0.45 <sup>b</sup>        | 5.30 ± 1.05 <sup>b</sup>        |
| FO            | 6   | 3.66 ± 1.50 <sup>c</sup>        | 3.06 ± 0.44 <sup>c</sup>        |
| FOC           | 6   | 3.11 ± 0.48 <sup>c</sup>        | 2.14 ± 0.46 <sup>c</sup>        |
| P-Value       |     |                                 |                                 |
| CLA           |     | 0.0001                          | 0.0001                          |
| Oil           |     | 0.0001                          | 0.0001                          |
| CLA × oil     |     | 0.0001                          | 0.0001                          |

Values with different letters are significant at  $p < 0.05$ .  
Values are mean ± SD. n : number of pooled samples.  
PGE<sub>2</sub> : prostaglandin E<sub>2</sub>  
TXB<sub>2</sub> : thromboxane B<sub>2</sub>

인 군 (BT, BTC)은 종양의 수효가 더 많았으며 FOC군에서는 1 mm이상인 종양은 나타나지 않았다. 또한 종양이 나온 위치는 BT군, BTC군, FO군에서는 주로 distal colon에서 대부분 발생하였으며 FOC군에서는 proximal colon에서 종양이 더 발생하였다.

### 2. 대장점막의 항산화효소 활성도

식이지방에 첨가한 CLA가 항산화효소에 미친 영향을 Table 4에서 살펴보면 CLA무첨가군 (BT, FO)에 비해 CLA첨가군 (BTC, FOC)은 SOD와 GSH-Px 활성도가 유의하게 높았다. 또한 전체적으로 BT를 먹인 군 (BT, BTC)에 비해 FO를 먹인 군 (FO, FOC)에서 유의하게 높게 나타났다.

### 3. 대장점막의 Prostaglandin E<sub>2</sub> 및 thromboxane A<sub>2</sub> 함량

Table 5에서 대장점막조직의 PGE<sub>2</sub>와 TXA<sub>2</sub> 함량을 살펴보면 BT군에 비해 BTC군에서 유의하게 낮았고 FO군과 FOC군간에는 유의한 차이를 보이지 않았다. 전체적으로

**Table 6.** Effect of CLA and n-3 fatty acid supplementation on fecal excretion of secondary bile acid in 1,2-dimethylhydrazine-treated rats

| Dietary groups | Deoxycholic acid            | Lithocholic acid            | Total bile acid          |
|----------------|-----------------------------|-----------------------------|--------------------------|
|                |                             | μg/g <sup>1)</sup>          |                          |
| BT             | 430.48 ± 62.93 <sup>a</sup> | 364.05 ± 51.16 <sup>a</sup> | 1.48 ± 0.10 <sup>a</sup> |
| BTC            | 307.61 ± 26.47 <sup>b</sup> | 243.81 ± 40.33 <sup>b</sup> | 1.11 ± 0.04 <sup>b</sup> |
| FO             | 237.42 ± 26.48 <sup>c</sup> | 186.57 ± 7.00 <sup>c</sup>  | 1.00 ± 0.02 <sup>c</sup> |
| FOC            | 155.56 ± 31.94 <sup>d</sup> | 156.00 ± 15.20 <sup>c</sup> | 0.73 ± 0.02 <sup>d</sup> |
| P-Value        |                             |                             |                          |
| CLA            | 0.0001                      | 0.0001                      | 0.0001                   |
| Oil            | 0.0001                      | 0.0001                      | 0.0001                   |
| CLA × oil      | NS                          | 0.0088                      | NS                       |

1): Dry feces. Values with different letters are significant at  $p < 0.05$ .  
Values are mean ± SD. NS : not significant  
Number of rats : 6 pooled samples (Each sample pooled two rats).

BT를 먹인 군 (BT, BTC)에 비해 FO를 먹인 군 (FO, FOC)에서 유의하게 낮게 나타났다.

### 4. 변종의 2차 담즙산 함량

변으로 배설된 1일 담즙산의 총함량과 제 2차 담즙산인 deoxycholic acid 배설량은 CLA무첨가군 (BT, FO)에 비해 CLA첨가군 (BTC, FOC)이 유의하게 낮았다. 그리고 BT를 먹인 군 (BT, BTC)에 비해 FO를 먹인군 (FO, FOC)에서 유의하게 낮았다 (Table 6). 제 2차 담즙산인 lithocholic acid 배설량은 BT군에 비해 BTC군에서 유의하게 낮았고, FO군에 비해 FOC군에서 더 낮았지만 유의한 수준은 아니었다. 지방에 따른 차이를 보여 BT를 먹인 군 (BT, BTC)에 비해 FO를 먹인군 (FO, FOC)에서 유의하게 낮았다.

## 고 찰

본 연구에서는 1%로 첨가된 CLA와 n-3 지방산이 대장암의 발생을 감소시킴을 볼 수 있었다. 이미 보고된 바에 의하면 CLA는 화학적 발암원으로 전위암을 유발시킨 생쥐에게 투여하였을 때 종양발생률을 유의하게 감소시켰고,<sup>2)</sup> 또한 화학적 발암원인 DMBA로 유방암을 유발시킨 쥐에게 CLA를 0.5% 함유한 semi-purified된 식이를 섭취시켰을 때도 유방암 발생률을 50%나 감소시켰다.<sup>20)</sup> Palombo et al의 연구에서는 인간의 전립선암 세포인 PC-3세포, 대장암 세포인 HT-9를 사용한 in vitro 실험에서 CLA는 암세포의 증식을 억제하였다고 보고하였다.<sup>20)</sup>

최근 연구에서는 어유에 풍부한 n-3 fatty acids의 항암 작용에 관해서 보고하였는데, in vitro 실험에서는 유방암

MCF-7 세포의 성장을 억제함으로써 유방암의 발생을 억제시켰고, 대장암을 발생시키는 cyclooxygenase-2 (COX-2)을 down-regulation 시키는 COX-2 inhibitor로써 작용하여 대장암의 발생을 억제시킴을 보고하였다.<sup>24)</sup> 본 연구에서도 CLA를 첨가한 군에서 대장의 종양발생률이 낮았고, 또한 BT를 먹인 군에 비해 FO를 먹인 군 (FO, FOC)에서 종양 발생률이 낮게 나타났고 종양의 크기와 분포에서도 더 낮음으로써 CLA와 어유는 종양의 발생을 억제하는 효과가 있다는 것을 보여주었다.

여러 실험을 통해 CLA가 항암 작용이 있음이 밝혀졌으나 어떠한 기전에 의해서 항암작용을 하는지에 관해서는 정확하게 알려진 바가 없기 때문에 CLA의 항암작용은 여러 측면에서 연구되어지고 있다. 본 연구에서는 세가지 측면에서 CLA의 항암작용을 살펴보았다. 첫째는 강력한 항산화제로써의 CLA의 작용을 살펴보기 위해 항산화효소의 활성도를 살펴보았고, 둘째는 대장암을 발생시키는 COX-2에 의해서 사용될 수 있는 arachidonic acid의 체내대사산물인 eicosanoids의 함량을 살펴보았고, 세 번째로는 변으로 배설되는 deoxycholic acid와 lithocholic acid의 함량을 살펴보았다.

강력한 항산화제로써의 CLA의 작용을 살펴보기 위해 항산화효소인 SOD와 GSH-Px 활성도를 살펴본 결과 CLA 무첨가군 (BT, CO)에 비해 CLA첨가군 (BTC, FOC)에서 유의적으로 높아짐을 관찰하였다. 여러보고에서도 CLA가 조직에서 강력한 항산화제로써 작용하여 in vitro와 생체내에서 산화적 stress를 억제시킨다고 보고하였다.<sup>2,25)</sup> 식이에 0.25% 이상 첨가된 CLA는 유선의 생화학적인 산화를 평가하는데 사용되어지는 표지물질인 thiobarbituric reactive substances (TBARS) 생성을 감소시켰고, 유방암 암화과정을 억제시켰다고 보고하였다.<sup>25)</sup> CLA의 항산화제로써의 효과를 살펴보기위해서 다른 항산화제와 비교한 논문에 의하면 peroxide 생성을 억제시키는 CLA의 효과는  $\alpha$ -tocopherol 보다 더 강력하였고, butylated hydroxytoluene의 효과와 비슷하였다.<sup>2)</sup> 또한 TBARS 생성을 억제시키는 CLA의 효과는 비타민 E와 butylated hydroxyanisole의 효과와 비슷함을 관찰하였다.<sup>25)</sup>

지금까지 연구된 보고에 의하면 식이지방이 암 발생에 영향을 주는 기전으로는 생체내에서 free radical 및 free radical에 의해 생성되는 과산화물질을 제거하는 효소의 작용에 의해 세포의 손상을 막음으로써 암 발생을 억제시킨다는 것이다. Yoon<sup>26)</sup>의 연구에 의하면 정상인 쥐의 간조직에서 CLA의 항산화 효과를 보기 위해 불포화도가 낮은 쇠기

름과 불포화도가 높은 어유에 CLA 혼합물을 식이무게의 1.0% 수준으로 함유한 실험식으로 30주 동안 사육하여 간 소포체에서 과산화물 형성과 cytosol의 항산화 효소의 활성도를 비교한 결과 불포화도가 높은 어유를 섭취한 군에서 지질의 과산화정도를 나타내는 malondialdehyde (MDA) 함량이 높았고, CLA에 의해서도 MDA 함량이 유의하게 감소되었다고 한다. 본 연구에서 식이지방의 항산화효과를 살펴보기위해서 SOD와 GSH-Px의 활성도를 측정한 결과 BT를 먹인 군 (BT, BTC)에 비해 FO를 먹인 군(FO, FOC)에서 유의하게 높게 나타났다. 이런 결과는 어유섭취군에서 세포막의 불포화도에 의해 생성되어지는 지질과산화물을 제거하기위한 기전으로 SOD와 GSH-Px의 활성이 유도되었을 것으로 생각된다.

이와 같이 in vivo 동물실험에서는 CLA가 항산화제로 작용하는 것으로 추정되고 있으나 아직 이 CLA의 항산화 기작이 정확하게 알려져 있지 않다. Ha 등<sup>27)</sup>은 크게 두가지로 대별하고 있다. 즉 CLA는 in vitro 실험에서 산화되면서 항산화성이 있는 구조로 변형되어 transition metal을 chelation함으로써 fenton 반응을 방해하기 때문이라는 것과 CLA 분자내에 있는 conjugated 이중결합 그 자체도 Fe과 같은 transtion metal을 역시 chelation 한다는 것으로 생각되고 있지만 아직까지 정확한 data가 없다고 하였다. 그렇지만 이와는 반대로 한 연구에서는 model membrane system에서 CLA가 radical scavenger로도 작용하지 않고, Fe<sup>2+</sup> ion-dependent oxidative reaction에서 metal chelator로 전환되지도 않으므로, CLA가 효과적인 항산화제나 항산화제의 전구체 기능이 없다고도 보고하였다.<sup>28)</sup> 본 연구에서는 CLA 첨가군과 어유첨가군에서는 항산화효소의 활성을 유도함으로써 암화과정을 억제시켰을 것으로 생각되었으나, 아직 그 기전에 관해서는 논란이 많기 때문에 이에 대한 더 많은 연구가 요구된다고 본다.

식에 첨가된 linoleic acid(LA)는 세포내의 LA 함량을 증가시키고, AA의 합성이 증가되어 PGE<sub>2</sub>와 TXB<sub>2</sub>의 생합성을 증가시킨다.<sup>29)</sup> AA로부터 합성된 eicosanoids인 PGE<sub>2</sub>, TXB<sub>2</sub>는 대장암과 전립선암의 증식을 증진시킨다고 보고되었다.<sup>30)</sup> 이는 eicosanoids가 정상적인 상피세포, fibroadenomas<sup>31)</sup>와 유방암 세포<sup>32)</sup>의 증식과 밀접한 관계가 있으며, cyclooxygenase metabolite인 PGE<sub>2</sub><sup>33)</sup>와 lipoxigenase metabolite인 LTB<sub>4</sub><sup>34)</sup>는 악성종양 세포의 증식을 증가시킨다고 한다. 반면에 CLA를 첨가한 식이를 투여하면 중성지방조직과 인지질 내의 CLA 함량이 증가하고 AA 함량은 감소되며 PGE<sub>2</sub>과 TXB<sub>2</sub> 합성이 감소하였는데 이와

같은 eicosanoid 합성 감소는 COX와 관련이 있다고 설명하였다.<sup>35,36)</sup> 이는 CLA를 섭취했을 때 CLA와 AA가 대사되는 과정에서 rate-limiting step인  $\Delta^6$ -desaturase의 기질로서 CLA가 LA와 경쟁하기 때문에 AA 합성이 감소된다.<sup>37)</sup> 이와 같은 conjugated diene bond를 가진 C18~20 지방산들은 COX의 inhibitor로서 eicosanoid 생성을 억제하므로<sup>38)</sup> CLA를 섭취에 의해 PGE<sub>2</sub>과 TXA<sub>2</sub> 합성이 감소되는 것으로 추측되고 있다. 본 연구에서도 CLA를 첨가한 군에서 대장점막의 PGE<sub>2</sub>와 TXA<sub>2</sub> 수준이 낮아진 것을 관찰할 수 있었다. 또한 어유를 섭취한 군이 BT군에 비하여 유의하게 낮아진 것을 관찰할 수 있었다. 이로 인해 식이에 CLA 첨가와 어유섭취는 PGE<sub>2</sub>와 TXA<sub>2</sub> 수준을 감소시킴으로써 세포가 외부의 자극을 받았을 때 대장의 암화과정을 예방할 수 있을 것으로 생각된다.

대장암의 암화과정에 있어서 담즙산 작용은 대장상피세포의 세포증식을 증가시켜 종양으로 발달시키는 것으로 보고되었는데 이런 작용은 2차 담즙산에서 보다 두드러지는 것으로 알려져 있다. 지금까지 알려진 2차 담즙산의 종양발생에 관한 작용을 살펴보면, 첫째, 2차 담즙산은 대장상피세포에 직접적으로 손상을 주어서 세포는 이 손상을 완화하려고 새로운 세포의 생성을 촉진시키며 이로인해 세포증식이 유도된다. 둘째, 2차 담즙산은 세포막을 자극하여 세포내로 AA를 유리시켜 이로인해 PGE<sub>2</sub>, TXA<sub>2</sub> 생성을 유도하여 세포내 신호전달체계에 변화를 가져와 세포증식을 자극한다. 셋째, 암화과정의 촉진단계에서 종양 성장에 중요한 역할을 하는 protein kinase C 같은 효소의 활성화에 2차 담즙산이 직접적으로 영향을 미쳐 세포증식을 증가시킨다.<sup>39,40)</sup> 고 보고되었다.

본 연구에서 CLA첨가군에서 변으로 배설된 1일 담즙산의 총합량과 2차 담즙산 배설량이 낮았고, BT를 먹인 군에 비해 FO를 먹인군(FO, FOC)에서 변으로 배설된 1일 담즙산의 총합량과 2차 담즙산 배설량이 유의하게 낮았다. 또한 변에 함유된 CLA함량은 CLA 첨가군에서만 검출되었는데 아마 섭취한 CLA는 완벽하게 흡수된 것이 아니고 변으로 적은량이 배설되어 CLA의 항암작용에 의해서 변 중 미생물균총에 영향을 주어 재흡수되지 않은 1차 담즙산이 2차 담즙산으로 전환이 적게 일어났을 가능성이 있다고 생각된다. 그러므로 흡수되지 않은 CLA는 대장의 미생물 균총에 영향을 주어 대장내의 담즙산 조성에도 영향을 주고 대장세포내에서 여러 생화학적인 변화를 일으킴으로써 이러한 변화가 대장암 발생을 억제 또는 지연시키는 요인이 될 수도 있다고 생각된다.

## 요약 및 결론

본 연구에서는 화학적 발암원으로 대장암을 유발한 후, 지방원을 달리한 식이에 첨가한 CLA (1%, w/w)와 n-3지방산이 대장암 암화과정에 미치는 영향을 살펴본 결과 CLA를 첨가한 군과 어유를 섭취한 군은 SOD와 GSH-Px 활성도가 높았고 eicosanoid 함량과 2차 담즙산 배설량은 낮았고 종양발생률이 감소함을 관찰하였다. 따라서 CLA와 n-3지방산은 생체내에서 여러 가지 기전을 통해 대장암 발생률을 감소시켜줄 수 있으므로 대장암 예방을 위한 식이로 CLA가 풍부한 식품인 우유와 치즈같은 낙농제품과 n-3지방산이 풍부한 생선의 섭취를 권장하는 것이 바람직하나 이를 실생활에 이용할 수 있는 CLA에 관한 적정 권장량이 밝혀지지 않았기 때문에 앞으로 항암작용과 항산화작용을 하는 CLA를 실생활에 이용할 수 있도록 알맞은 권장량을 정하는 것에 관한 연구가 필요하다고 사료된다.

## Literature cited

- 1) Ha YL, Grimm NK, Pariza MW. Anticarcinogens from fried ground beef: heat-altered derivatives of linoleic acid. *Carcinogenesis* 8: 1881-1887, 1987
- 2) Ha YL, Strokson JM, Pariza MW. Inhibition of benzo(a)pyrene-induced mouse forestomach neoplasia by conjugated dienoic derivatives of linoleic acid. *Cancer Res* 50: 1097-1101, 1990
- 3) Roebuck BD, Longnecker DS, Baumgartner KJ, Thron CD. Carcinogen-induced lesions in rat Pancreas: effects of varying levels of essential fatty acid. *Cancer Res* 45: 5252-5256, 1985
- 4) Ip C, Carter CA, Ip MM. Requirement of essential fatty acid for mammary tumorigenesis in the rat. *Cancer Res* 45: 1997-2001, 1985
- 5) Ip C, Singh M, Thompson HJ, Scimeca JA. Conjugated linoleic acid suppresses mammary gland in rat. *Cancer Res* 54: 1212-1215, 1994
- 6) Cook ME, Miller CC, Park Y, Pariza MW. Immune modulation by altered nutrient metabolism: Nutritional control of immune-induced growth depression. *Poultry Sci* 72: 1301-1305, 1993
- 7) Kang KJ, Park HS. Effects of conjugated linoleic acid supplementation on fat accumulation and degradation in rats. *Korean J Nutrition* 34(4): 367-374, 2001
- 8) Jung SM, Kang KJ, Park HS. Effect of dietary conjugated linoleic acid on plasma lipid composition in rats. *Korean J Nutrition* 9(4): 439-447, 1999
- 9) Park HS. Mechanism of cancer prevention and other physiological function by conjugated linoleic acid. *Korean J Nutrition* 33: 556-565, 2000
- 10) Hubbard NE, Lim D, Summers L, Erickson KL. Reduction of murine mammary tumor metastasis by conjugated linoleic acid. *Cancer Letters* 150: 93-100, 2000
- 11) Belury MA, Bird C, Nickel KP, Wu B. Inhibition of mouse skin tumor promotion by dietary conjugated linoleate. *Nutr Cancer*

- 26: 149-157, 1996
- 12) Cesano A, Visonneau S, Scimeca JA, Kritchevsky D, Santoli D. Opposite effect of linoleic acid and conjugated linoleic acid on human prostatic cancer in SCID mice. *Anticancer Res* 18: 1429-1434, 1998
  - 13) Liew C, Shut HA, Chin SF, Pariza MW, Dashwood RH. Protection of conjugated linoleic acids against 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinolin-induced colon carcinogenesis in the F344 rat: a study of inhibitory mechanisms. *Carcinogenesis* 16: 3037-3043, 1995
  - 14) Ito N, Hirose M. Anti-oxidants: carcinogenic and chemopreventive properties. In: Vande Woude GF, Klein G, eds. *Advances in cancer research*. San Diego, CA: Academic Press 53: 247-302, 1989
  - 15) Ip C, Chin SF, Scimeca JA, Pariza MW. Mammary cancer prevention by conjugated dienoic derivative of linoleic acid. *Cancer Res* 51: 6118-6124, 1991
  - 16) Park HS, Ryu JH, Ha YL, Y. Park JH. Dietary conjugated linoleic acid induces apoptosis of colonic mucosa in 1,2-dimethylhydrazine-treated rats: a possible mechanism of the anticarcinogenic effect by CLA. *Br J Nutr* 86: 549-555, 2001
  - 17) Winterbourn CC, Hawkins RE, Brian M, Carrell RW. The estimation of red cell superoxide dismutase activity. *J Lab Clin Med* 85(2): 337-341, 1975
  - 18) Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 70(1): 158-169, 1967
  - 19) Granstrom E, Samuëlsson B. Quantitative measurement of prostaglandins and thromboxanes: general considerations. *Adv Prostaglandin Thromboxane Res* 5: 1-13, 1978
  - 20) Shaw JE, Ramwell PW. Separation, identification and estimation of prostaglandins. *Methods Biochem Anal* 17: 325-371, 1969
  - 21) Uchida K, Nomura Y, Kadiwaki M, Takeuchi N, Yamamura Y. Effect of dietary cholesterol on cholesterol and bile acid metabolism in rats. *Japan J Pharmacol* 27: 193-204, 1977
  - 22) Ip C, Chin SF, Scimeca JA, Pariza MW. Mammary cancer prevention by conjugated dienoic derivative of linoleic acid. *Cancer Res* 51: 6118-6124, 1991
  - 23) Palombo JD, Ganguly A, Bistran BR, Menard MP. The antiproliferative effects of biologically active isomers of conjugated linoleic acid on human colorectal and prostatic cancer cells. *Cancer Letters* 177: 163-172, 2002
  - 24) Rose DP, Connolly JM. Omega-3 fatty acids as cancer chemopreventive agents. *Pharmacology & Therapeutics* 83: 217-244, 1999
  - 25) Ip C, Chin SF, Scimeca JA, Pariza MW. Mammary cancer prevention by conjugated dienoic derivative of linoleic acid. *Cancer Res* 51: 6118-6124, 1991
  - 26) Yoon KM. Effect of conjugated linoleic acid on hepatic peroxidation status and antioxidant enzyme system in rats. *Master Thesis*, Kyung Hee University, 1999
  - 27) Ha YL, Pariza MW. Naturally-occurring novel anticarcinogens: conjugated dienoic derivatives of linoleic acid (CLA). *J Korean Soc Food Nutr* 24(4): 401-407, 1991
  - 28) Jeroen JM van den Berg, Cook NE, Tribble DL. Reinvestigation of the antioxidant properties of conjugated linoleic acid. *Lipids* 30(7): 599-605, 1995
  - 29) Reddy BS. Novel approaches to the prevention of colon cancer by nutritional manipulation and chemoprevention. *Cancer Epidemiol Biomarkers & Prev* 9: 239-247, 2000
  - 30) Qiao L, Kozoni V, Tsioulas GJ, Koutsos MI, Hanif R, Shiff SJ, Rigas B. Selected eicosanoids increase the proliferation rate of human colon carcinoma cell lines and mouse colonocytes in vivo. *Biochim Biophys Acta* 1258: 215-223, 1995
  - 31) Balakrishnan A, Cramer S, Banyopadhyay GK, Imagawa W, Yang J, Elias J, Beattie CW, Gupta TDK, Nandi S. Differential proliferative response to linoleate in cultures of epithelial cells from normal human breast and fibroadenomas. *Cancer Res* 49: 857-862, 1989
  - 32) Rose DP, Connolly JM. Effect of fatty acid and inhibitors of eicosanoid synthesis on the growth of a human breast cancer cell line in culture. *Cancer Res* 50: 7139-7144, 1990
  - 33) Lee PP, Ip MM. Regulation of proliferation of rat mammary tumor cells by inhibitors of cyclooxygenase and lipoxygenase. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 45: 21-31, 1992
  - 34) Snyder DS, Castro R, Desforges JF. Antiproliferative effects of lipoxygenase inhibitors on malignant human hematopoietic cell lines. *Exp Hematol* 17: 6-9, 1989
  - 35) Truitt A, Mcneill G, Vanderhoek JY. Antiplatelet effects of conjugated linoleic acid isomers. *Biochim Biophys Acta* 1438: 239-246, 1999
  - 36) Liu K, Belury MA. Conjugated linoleic acid reduces arachidonic acid content and PGE2 synthesis in murine keratinocytes. *Cancer Letters* 127: 15-22, 1998
  - 37) Belury MA, Kempa-Steczko A. Conjugated linoleic acid modulates hepatic lipid composition in mice. *Lipids* 32: 199-204, 1997
  - 38) Nugteren DH. Inhibition of prostaglandin biosynthesis by 8cis, 12trans, 14cis-eicosatrienoic acid and 5cis, 8trans, 12trans, 14cis-eicosatetraenoic acid. *Biochim Biophys Acta* 210: 171-176, 1970
  - 39) DeRubertis FR, Craven PA. Arachidonic acid metabolism and colorectal cancer. *Colorectal Cancer*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg pp.184-201, 1989
  - 40) Nagengast FM, Grubben MJAL, vanMunster IP. Role of bile acids in colorectal carcinogenesis. *Eur J Cancer* 31: 1067-1070, 1995
  - 41) Reddy BS. Dietary fat and its relationship to large bowel cancer. *Cancer Res* 41: 3700-3705, 1981
  - 42) DeRubertis FR, Craven PA, Saito R. Bile salt stimulation of colonic epithelial proliferation. *J Clin Invest* 74: 1614-1624, 1984
  - 43) Cohen BI, Deschner EE. The role of bile acids in colorectal carcinogenesis. *Colorectal Cancer*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg pp.202-216, 1989
  - 44) Craven PA, Pfanstiel J, Saito R, DeRubertis FR. Relationship between loss of rat colonic surface epithelium induced by deoxycholate and initiation of subsequent proliferative response. *Cancer Res* 46(11): 5754-5759, 1986